Cry1Ie 毒素胁迫下亚洲玉米螟的抗性发展及汰选种群对其他 Bt 毒素的交互抗性

贺明霞[1,2], 何康来[2,*], 王振营[2], 王新颖[2], 李　庆[1,*]
(1. 四川农业大学农学院, 成都 611130; 2. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193)

摘要: 亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* (Guenée) 是危害玉米的重要害虫之一, 转 Bt 基因抗虫玉米为其防治提供了新的途径。然而, 靶标害虫产生抗性将严重阻碍 Bt 制剂及转 Bt 基因抗虫玉米的持续应用。明确害虫对转 Bt 基因玉米表达的毒素蛋白的抗性演化, 对于制定科学有效的抗性治理策略具有重要的理论和实际意义。本实验通过人工饲料汰选法研究了 Bt Cry1Ie 毒素胁迫下亚洲玉米螟的抗性发展及汰选 14 代的种群对其他 Bt 毒素(Cry1Ab, Cry1Ac 和 Cry1Fa)的交互抗性, 并观察了 Cry1Ie 蛋白胁迫对亚洲玉米螟生物学的影响。结果表明: 随着汰选压不断提高, 亚洲玉米螟种群对 Cry1Ie 毒素的敏感性逐渐下降。汰选 14 代后, 种群对 Cry1Ie 毒素的抗性水平提高了 23 倍。然而, Cry1Ab, Cry1Ac 和 Cry1Fa 对所获 Cry1Ie 汰选种群的毒力与对敏感种群的毒力相比没有显著差异, 说明 Cry1Ie 汰选没有引起亚洲玉米螟对 Cry1Ab, Cry1Ac 和 Cry1Fa 毒素产生交互抗性。同时, 与敏感种群相比, Cry1Ie 汰选 14 代的种群幼虫平均发育历期延长 5.7 d, 蛹重减轻 13.7%, 单雌产卵量下降 40.0%。本研究结果说明, 大面积单一种植转 cry1Ie 基因抗虫玉米, 可能引起亚洲玉米螟产生抗性; 亚洲玉米螟 Cry1Ie 抗性种群对 Cry1Ab, Cry1Ac 和 Cry1Fa 没有交互抗性, 含有 *cry1Ie* 和 *cry1Ab*, *cry1Ac* 或 *cry1F* 双/多基因抗虫玉米, 可作为靶标害虫抗性治理的重要策略。

关键词: 亚洲玉米螟; Bt 毒素; 抗性汰选; 抗性发展; 生物学; 抗性治理
中图分类号: Q965.9　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 0454-6296(2013)10-1135-08

Selection for Cry1Ie resistance and cross-resistance of the selected strain to other Cry toxins in the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Crambidae)

HE Ming-Xia[1,2], HE Kang-Lai[2,*], WANG Zhen-Ying[2], WANG Xin-Ying[2], LI Qing[1,*] (1. Agronomy College, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China; 2. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: The Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Guenée), is one of the most important insect pests of maize in China. Transgenic *Bacillus thuringiensis* (Bt) maize provide an effective mean to control this insect pest. However, evolution of resistance in the target insect will be a great threat to the continued success of Bt toxins used in insecticide formulations or expressed by transgenic maize. It is theoretically and practically important to well characterize resistant strains, which will provide the only way to empirically validate proposed management strategies. A strain of *O. furnacalis* was selected for resistance to Cry1Ie by exposure to the toxin incorporated into artificial diet in the laboratory. The resistance development and cross-resistance to other Bt toxins such as Cry1Ab, Cry1Ac and Cry1Fa after 14 generations of selection were determined by bioassay. In addition, the changes in biology of *O. furnacalis* were also observed. The results indicated that the susceptibility of the selected strain to Cry1Ie toxin declined as the selection pressure increased. The selected strain developed higher than 23-fold resistance to Cry1Ie after 14 generations of selection. However, it was as susceptible to Cry1Ab, Cry1Ac, and Cry1Fa as the unselected control strain. In addition, compared with the unselected strain, the larvae of selected strain required an average 5.7 d longer duration, the pupal weight reduced by 13.7%, and the number of eggs laid per female decreased by 40.0%. These results suggest that the widespread use of

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项(2012ZX08011003-005)
作者简介: 贺明霞, 女, 1988 年生, 湖北天门人, 硕士研究生, 研究方向为靶标害虫抗性机理, E-mail: hemingxia2605@126.com
* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: klhe@ippcaas.cn; liq8633@163.com
收稿日期 Received: 2013-04-15; 接受日期 Accepted: 2013-09-06

transgenic Cry1Ie maize could lead to the development of resistance in target pest *O. furnacalis*. The lack of cross-resistance between Cry1Ie and Cry1Ab, Cry1Ac or Cry1Fa suggests that maize hybrids expressing these two toxins (Cry1Ie and Cry1Ab, Cry1Ac or Cry1F) are likely to be compatible for resistance management of *O. furnacalis*.

Key words: *Ostrinia furnacalis*; Bt toxins; selection for resistance; resistance development; biology; resistance management

亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* (Guenée)是我国危害玉米最重要的害虫。虽然科学家已研发了包括农业防治、化学防治、物理防治、生物防治和性信息素防治等多种综合防治技术策略(周大荣等，1995)，随着社会和经济的发展及保护环境的需要，亟需既经济、简便易行，又环境友好的新的玉米螟可持续绿色防控技术。国际上，美国分别于 1996 年和 2003 年应用转 Bt *cry1Ab* 及 *cry1F* 基因抗虫玉米防治欧洲玉米螟 *Ostrinia nubilalis* (Hbn.)等鳞翅目害虫。为玉米螟防治提供了新的高效、经济、无污染的综合防治技术措施(Hellmich *et al*., 2001; Shelton *et al*., 2002; Naranjo *et al*., 2005)。菲律宾 2003 年起种植转 Bt 基因抗虫玉米防治亚洲玉米螟，农民每亩增收 74 元，减少用药每亩节约 1.5 元，取得了良好的防治效果和经济效益，2012 年种植面积达已达 678 000 公顷(James, 2003, 2012)，同时田间有益昆虫如步甲、花蝽、蜘蛛等数量增加。在国内，室内和田间试验表明国外转 *cry1Ab* 基因抗虫玉米对亚洲玉米螟、粘虫 *Mythimna separata* Walker 和棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hbn.)都具有很好的防治效果(He *et al*., 2003; 王振营等，2005; 常雪艳等，2006)。近年来报道国产转 *cry1Ac*、*cry1Ie-cry1Ac* 和 *cry1Ah/Ie* 基因抗虫玉米亦表现出了良好的抗虫效果(岳同卿等，2010; 杨召军等，2012; 王培等，2012)。特别是 Cry1Ie 毒素对亚洲玉米螟、小菜蛾 *Plutella xylostella*、大豆食心虫 *Leguminivora glycinivorella* (Song *et al*., 2003)以及棉铃虫(Lian *et al*., 2008)等具有较好的毒力。转 *cry1Ie* 玉米不但对亚洲玉米螟、棉铃虫有良好的抗虫效果，而且对 Cry1Ac 抗性棉铃虫具有良好的抗虫性(Zhang *et al*., 2013)。这些成果为今后应用转 Bt 基因抗虫玉米防治亚洲玉米螟等害虫提供了技术储备。

靶标害虫对转 Bt 基因抗虫玉米产生抗性将严重阻碍这一技术的可持续应用。室内汰选实验表明害虫对 Bt 毒素产生抗性是广泛存在的(Tabashnik, 1994; Ferré and Van Rie, 2002)，例如印度谷螟 *Plodia interpunctella* (Hbn.) (McGaughey, 1985)、欧洲玉米螟(Huang *et al*., 1997; Bolin *et al*., 1999)、亚洲玉米螟(韩海亮等，2009; Xu *et al*., 2010)和棉铃虫(Meng *et al*., 2003; Lu *et al*., 2004)等。He 等(2005)报道了我国春、夏玉米区亚洲玉米螟种群对 Cry1Ab 毒素的敏感性存在显著差异。在田间，由于秋粘虫 *Spodoptera frugiperda* (Smith)对表达 Cry1F 毒素玉米产生抗性，陶氏益农(Dow Agrosciences)已停止其在波多黎各销售(Storer *et al*., 2010, 2012)。因此，制定有效的抗性治理策略是保障转基因抗虫玉米可持续利用所必须的科学举措。目前"高剂量 + 庇护所"和"多基因"策略是被普遍接受的有效治理或延缓害虫产生抗性的重要途径(Roush, 1997, 1998; Gould, 1998; Zhao *et al*., 2003)。然而，只有深入了解靶标害虫抗性种群的特性，才能有的放矢制定科学合理的抗性治理对策。室内汰选抗性种群为开展靶标害虫抗性演化及其生物学、遗传学、生理生化基础等研究提供所必需的科研材料。本文报道了室内汰选条件下亚洲玉米螟对 Cry1Ie 毒素的抗性发展、抗性种群的生物学变异及对其他 Bt 毒素的交互抗性，为今后国产转基因玉米的生产应用，实施合理的害虫抗性治理策略提供重要的科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试 Bt 蛋白

实验所用 Cry1Ab，Cry1Ac 和 Cry1Fa 蛋白为市购商品，由美国 Case Western Reserve University 的 Marianne P. Carey 实验室生产，是经胰蛋白酶活化的毒素。Cry1Ie 蛋白由中国农业科学院植物保护研究所提供，以 50 mmol/L Na_2CO_3 (pH 10)溶液溶解。

1.2 供试昆虫

亚洲玉米螟敏感品系 ACB-BtS 原采自陕西西安玉米田的种群，在 28 ± 1℃、光周期 16L:8D、RH 70%~80% 的条件下用无琼脂半人工饲料饲养的室内种群。

1.3 抗性种群的汰选

采用饲料混合法进行室内人工汰选，即将 Cry1Ie 蛋白添加到亚洲玉米螟半人工饲料中配成汰选饲料，在幼虫期以汰选饲料饲养，起始种群约 4 000头初孵幼虫，分 3 盒饲养。在室内生测的基础上，设定了汰选饲料的初始蛋白浓度为 0.05 ng/g(蛋白/饲料)，隔 1 代或数代后再提高汰选浓度，达到约 60% ~70% 汰选压。记录各代从初孵卵到化蛹的发育历期；取 300 头左右的蛹随机分成 3 组，分别称重，羽化后记录雌、雄蛾数，并装笼，每天记录产卵量。最后统计分析幼虫发育历期、蛹重、雌雄性比和单雌产卵量。

1.4 毒力测定

Bt 蛋白对亚洲玉米螟毒力的生物测定采用饲料混合法(He *et al.*, 2005)，即用蒸馏水将 Bt 蛋白配制成 8 ~9 个浓度梯度，加入亚洲玉米螟无琼脂半人工饲料中配成生测饲料，以蒸馏水作空白对照。将生测饲料分装到 48 孔培养板中，每孔接 1 头孵化 2 ~12 h 待测试品系的初孵幼虫，每浓度 1 板，放入 28 ±1℃、RH 70% ±10%、光周期 16L:8D 的养虫室中饲养，7 d 后记录存活幼虫数并称重。所有生测实验重复 3 次。

1.5 数据统计与分析

Bt 蛋白对亚洲玉米螟的作用表现为致死和抑制生长。毒力生物测定实验中，存活幼虫单头体重 <0.2 mg 或龄期仍然处于 2 龄以下者按死亡计算，即死亡率(%) =100 ×(测试虫数 - 存活虫数 + 存活幼虫单头体重 <0.2 mg 或龄期仍然处于 2 龄以下的虫数)/测试虫数，再计算校正死亡率(%) = 100 ×(处理死亡率 - 对照死亡率)/(1 - 对照死亡率)；生长抑制率(%) = (1 - 处理存活幼虫体重/对照存活幼虫体重) ×100。采用 PoloPlus 统计软件中 Probit Analysis 程序分析计算各蛋白对试虫品系的 LC_{50} 和 LC_{90} 值及 95% 置信区间，以及有效抑制生长率 50% 和 95% 的剂量，即 EC_{50} 和 EC_{95} 值及 95% 置信区间；比较各代 LC_{50} 或 EC_{50} 间的差异，计算抗性增长倍数或抗性指数(resistance index, RI)，RI = 子代 LC_{50} 或 EC_{50}/F_0 代 LC_{50} 或 EC_{50}。各代幼虫发育平均历期、蛹重和单雌产卵量的差异显著性分析采用单因素方差分析法，平均数差异显著性分析采用 LSD 法比较，雌雄性比与敏感性品系的差异显著性分析采用 χ^2 检验。

2 结果与分析

2.1 Cry1Ie 胁迫下亚洲玉米螟的抗性发展动态

Cry1Ie 定向选择下，亚洲玉米螟对 Cry1Ie 的敏感性产生了显著变化。随着汰选压的不断提高，亚洲玉米螟对 Cry1Ie 的抗性水平逐渐增加(表 1)。从汰选前 5 代各种群的毒力生测结果可以看出，Cry1Ie 蛋白对 F_1 到 F_5 种群的 LC_{50} 没有显著差异，即各代汰选种群对 Cry1Ie 的敏感水平没有发生显著性变化。当汰选压继续提高，汰选到第 8 代时，Cry1Ie 蛋白对 F_8 种群的 LC_{50} 显著高于 F_1 - F_5，是敏感种群的 5 倍。之后，F_{11} 和 F_{14} 抗性指数有显著提高，分别达 14 倍和 23 倍。

表 1　Cry1Ie 对不同汰选代数的亚洲玉米螟的毒力

Table 1　Susceptibility of Cry1Ie selected strain of *Ostrinia furnacalis* at different generations of selection

汰选代数 Generations of selection	LC_{50} (95% FL) (μg/g)	LC_{95} (95% FL) (μg/g)	抗性指数 Resistance index (RI)	斜率 Slope ± *SE*	χ^2
F0 (BtS)	2.31 (1.51 -3.11) c	21.60 (15.00 -37.57) d	-	1.69 ±0.18 a	29.47
F1	2.22 (1.32 -3.25) c	34.72 (21.42 -72.89) cd	1.0 (0.6 -1.5)	1.38 ±0.15 ab	16.85
F2	3.33 (2.42 -4.33) c	60.86 (42.62 -97.46) c	1.4 (1.0 -2.1)	1.30 ±0.11 ab	25.10
F3	3.87 (2.30 -5.93) c	72.89 (34.84 -214.65) bc	1.7 (1.1 -2.5)	1.29 ±0.12 ab	30.11
F5	4.02 (2.39 -6.12) c	77.42 (40.39 -225.48) bc	1.7 (1.2 -2.6)	1.28 ±0.12 ab	28.24
F8	11.39 (7.26 -17.40) b	345.57 (150.69 -1 476.08) ab	5.0 (3.4 -7.2)	1.11 ±0.10 b	65.75
F11	32.54 (24.98 -45.18) a	942.07 (428.33 -3 338.10) a	14.1 (9.3 -21.3)	1.12 ±0.14 b	18.66
F14	53.57 (37.31 -95.38) a	1 467.30 (508.53 -10 804.00) a	23.2 (13.7 -40.0)	1.14 ±0.18 b	20.20

同一列平均值(±*SE*)后字母不同者表示 LSD 测验差异显著(P <0.05)。下表同。Means ± *SE* within a column followed by different letters were significantly different by Fisher's Protect LSD test (P <0.05). The same for the following tables.

从生长抑制率看，随着汰选压的提高，有效抑制幼虫生长率50%的浓度显著增加。汰选1代，种群的 EC_{50}已显著高于敏感对照，抗性指数达到3.6倍(表2)。汰选5，8和14代后，种群的抗性指数已分别提高到9.9，24.4和58.8倍。可以看出，抗性首先表现在生长适应性上，随着汰选代数增加，生长适应性提高速率明显高于生存率。

表2 Cry1Ie 对不同汰选代数的亚洲玉米螟生长抑制率

Table 2 Susceptibility of Cry1Ie selected strain of *Ostrinia furnacalis* at different generations of selection based on the EC_{50} (effective concentration causing 50% growth inhibition) and EC_{95}

汰选代数 Generations of selection	EC_{50} (95% FL) (μg/g)	EC_{95} (95% FL) (μg/g)	抗性指数 Resistance index (RI)	斜率 Slope ± *SE*	χ^2
F0 (BtS)	0.11 (0.06 - 0.18) e	7.84 (4.47 - 17.51) b	-	0.89 ± 0.02	417.18
F1	0.41 (0.25 - 0.61) dc	21.65 (10.80 - 59.51) b	3.6 (3.3 - 4.1)	0.95 ± 0.01	627.63
F2	0.57 (0.38 - 0.82) dc	12.43 (7.26 - 26.78) b	5.2 (4.7 - 5.7)	1.23 ± 0.01	2 228.70
F3	0.67 (0.40 - 1.09) dc	25.10 (11.38 - 81.26) b	6.0 (5.4 - 6.7)	1.04 ± 0.01	962.45
F5	1.10 (0.72 - 1.69) c	25.34 (13.01 - 65.60) b	9.9 (8.9 - 11.0)	1.21 ± 0.02	837.46
F8	2.72 (1.64 - 4.62) b	574.46 (172.95 - 4 075.86) a	24.4 (22.2 - 27.0)	0.71 ± 0.01	2 060.90
F11	4.84 (2.87 - 8.61) ab	580.40 (181.00 - 3 956.80) a	43.5 (38.5 - 47.6)	0.79 ± 0.01	2 028.40
F14	6.54 (4.90 - 8.93) a	528.29 (264.34 - 1 324.00) a	58.8 (52.6 - 66.7)	0.86 ± 0.01	279.22

2.2 Cry1Ie 汰选种群对其他 Bt 蛋白的交互抗性

测定 Cry1Ab，Cry1Ac 和 Cry1Fa 蛋白分别对亚洲玉米螟敏感种群和以 Cry1Ie 蛋白汰选14代的种群毒力结果显示，敏感种群和汰选种群的 LC_{50}值之间没有显著差异(表3)。剂量死亡率曲线的回归斜率之间亦没有显著差异。这说明以 Cry1Ie 蛋白汰选14代的亚洲玉米螟种群对 Cry1Ab，Cry1Ac 和 Cry1Fa 蛋白的敏感性没有下降，即没有引起亚洲玉米螟对这3种 Bt 杀虫蛋白产生交互抗性。

表3 Cry1Ie 汰选14代的亚洲玉米螟种群对 Cry1Ab，Cry1Ac 和 Cry1Fa 的敏感性

Table 3 Susceptibility of the Cry1Ie-selected strain of *Ostrinia furnacalis* (generation 14) to Cry1Ab, Cry1Ac and Cry1Fa

Bt 蛋白 Bt toxin	种群 Population	LC_{50} (95% FL) (μg/g)	斜率 Slope ± *SE*	χ^2	抗性指数(95% FL) RI
Cry1Ab	ACB-IeR	0.60 (0.31 - 1.00)	0.81 ± 0.06	55.15	1.2 (0.7 - 2.1)
	ACB-BtS	0.48 (0.33 - 0.69)	0.90 ± 0.08	13.83	1.0
Cry1Ac	ACB-IeR	0.71 (0.50 - 0.97)	0.88 ± 0.06	37.18	1.0 (0.6 - 1.5)
	ACB-BtS	0.73 (0.40 - 1.18)	0.92 ± 0.07	26.49	1.0
Cry1Fa	ACB-IeR	4.81 (3.32 - 6.80)	0.77 ± 0.06	28.18	1.4 (0.9 - 2.3)
	ACB-BtS	3.45 (1.58 - 6.79)	0.81 ± 0.07	42.82	1.0

2.3 Cry1Ie 蛋白胁迫对亚洲玉米螟生物学的影响

Cry1Ie 蛋白胁迫对亚洲玉米螟的生长发育和繁殖特征出现了显著的变化(表4)。随着汰选压的增加，幼虫发育历期逐渐增加、蛹重下降、单雌产卵量减少。与敏感种群相比，经14代汰选的抗性种群，平均幼虫发育历期延长了近6 d，蛹重平均下降了13.7%，单雌平均产卵量下降了40.0%。与此同时，在未添加 Cry1Ie 蛋白的普通人工饲料上继代饲养14代的敏感种群，幼虫发育历期、蛹重和产卵量没有显著变化。

此外，虽然在 Cry1Ie 蛋白定向选择下，亚洲玉米螟种群的性比有下降趋势，但与敏感种群没有显著差异(χ^2 = 0.09 ~ 3.51)，仍然符合1∶1的性比关系。

表 4　亚洲玉米螟 Cry1Ie 抗性汰选过程中的适应性变化

Table 4　Fitness changes of the Cry1Ie-selected *Ostrinia furnacalis* on artificial diet

汰选代数 Generations of selection	幼虫期(d) Larval duration	蛹重(mg) Pupal weight	单雌产卵量(粒/♀) Number of eggs laid per female	性比(♀:♂) Sexual ratio
F0 (BtS)	15.3 ±0.3 e	52.8 ±0.4 a	144.7 ±5.4 a	0.98 ±0.05
F2	17.0 ±0.6 d	51.3 ±0.3 a	127.0 ±1.7 b	0.79 ±0.01
F5	18.3 ±0.3 c	50.5 ±0.8 ab	115.0 ±3.85 bc	0.84 ±0.07
F8	19.3 ±0.3 bc	47.4 ±0.7 bc	111.72 ±2.4 cd	0.82 ±0.04
F11	20.3 ±0.3 ab	46.2 ±2.1 c	100.3 ±5.6 d	0.79 ±0.08
F14	21.0 ±0.6 a	45.6 ±1.1 c	87.3 ±3.8 e	0.83 ±0.05

幼虫期 Larval duration：$F = 24.40$；$df = 5,12$；$P < 0.0001$；蛹重 Pupal weight：$F = 7.29$；$df = 2,12$；$P = 0.0024$；单雌产卵量 Number of eggs laid per female：$F = 24.62$；$df = 2,12$；$P < 0.0001$.

3　讨论

本研究所用 Cry1Ie 蛋白是中国农业科学院植物保护研究所研发的 *cry1Ie* 基因的表达产物，对亚洲玉米螟、小菜蛾 *P. xylostella*、大豆食心虫 *L. glycinivorella*（Song *et al.*, 2003）以及棉铃虫（Lian *et al.*, 2008）等具有较高的毒力。Liu 等（2013）报道了转 *cry1Ie* 玉米对亚洲玉米螟的良好杀虫效果，并对 Cry1Ac 抗性棉铃虫具有良好的抗虫性。

亚洲玉米螟和欧洲玉米螟是转基因玉米的重要靶标害虫，已有许多研究表明二者均在室内汰选条件下对不同 Bt 毒素可产生抗性。如欧洲玉米螟抗 Cry1Ac（Bolin *et al.*, 1999）、Cry1Ab（Chaufaux *et al.*, 2001；Siqueira *et al.*, 2004）、Cry1F（Pereira *et al.*, 2008）以及 Bt 制剂 Dipel ES（Huang *et al.*, 1997）等，亚洲玉米螟抗 Cry1Ab（Xu *et al.*, 2010）和 Cry1Ac（韩海亮等，2009）。Crespo 等（2009）首次报道了采自美国明尼苏达的欧洲玉米螟田间种群对 Cry1Ab 抗性达到 800 倍，并可在转基因玉米上取食 Cry1Ab 毒素表达量较低的组织上存活。菲律宾自 2003 年商业化种植 MON810 以来亚洲玉米螟对 Cry1Ab 的敏感性下降（Alcantara *et al.*, 2011）。本研究首次报道了亚洲玉米螟在室内汰选条件下，经过 14 代可对 Cry1Ie 毒素产生 23 倍抗性。Bolin 等（1999）采用幼龄期短时间取食含 Cry1Ac 饲料的汰选法汰选欧洲玉米螟 8 代，种群的抗性水平提高了 162 倍。Siqueria 等（2004）以整个幼虫期取食 Cry1Ab 饲料，以约 60% 的汰选压（死亡率）汰选欧洲玉米螟 10 代，种群的抗性水平最高提高了 10 倍；Pereira 等（2008）以含 Cry1F 人工饲料汰选欧洲玉米螟 35 代，种群的抗性达到 3 000 倍。韩海亮等（2009）以含 Cry1Ac 蛋白人工汰选亚洲玉米螟 27 代，汰选压 40% ~ 70%，种群的抗性水平达到了 14.0 倍。由此可知，不同汰选方法和汰选压对抗性的演化速率的影响有很大差异。在较低汰选压下，抗性的发展速率较低。

在已报道的室内抗性汰选研究中，有研究比较了生长抑制率和死亡率计算的抗性倍数（Siqueria *et al.*, 2004），虽然前者变化幅度高于后者，但二者的趋势基本相同。本研究中，Cry1Ie 毒素对经过 14 代汰选的亚洲玉米螟种群的 EC_{50} 提高了 58.8 倍，变化幅度明显高于死亡率的变化幅度，即对抗性的变化能更灵敏地显示出来。因此，在今后的监测计划中，应综合考察生长抑制率和死亡率变化。

靶标害虫对一种 Bt 毒素产生抗性的同时，对其他具有相同或相似作用位点的 Bt 毒素会产生交互抗性，而对不同类型作用位点的 Bt 毒素没有或仅有较低水平的交互抗性。如蔗螟 *Diatraea saccharalis*（F.）Cry1Ab 抗性品系对 Cry1Aa 和 Cry1Ac 有交互抗性，与 Cry2Ab 则没有（Wu *et al.*, 2009）。对 Bt 制剂 Dipel 抗性达 47 倍的欧洲玉米螟抗性品系对 Cry1Aa，Cry1Ab，Cry1Ac 和 Cry2Aa 前毒素的抗性分别高达 170，205，524 和 640 倍以上，对 Dipel 中不含有的 Cry1Ba 前毒素的抗性倍数为 36 倍（Li *et al.*, 2005）；从田间采回来的欧洲玉米螟在室内用 Cry1Ab 进行抗性汰选，对 Cry1Ab 的抗性达 1 000 倍以上，对 Cry1Ac 和 Cry1Aa 有显著的高水平交互抗性，对 Cry1F 仅有 <4 倍的较低水平交互抗性（Crespo *et al.*, 2011）。Cry1Ab 汰选的亚洲玉米螟对 Cry1Ah 和 Cry1Ac 有较高的交互抗性，对 Cry1F 的交互抗性水平较低，而对 Cry1Ie 没有交

互抗性(Xu *et al*., 2010)。本研究结果显示 Cry1Ie 汰选的亚洲玉米螟抗性种群与 Cry1Ab, Cry1Ac 和 Cry1Fa 均不存在交互抗性。

Bt 毒素通过与靶标害虫中肠特异性结合位点的受体结合，在中肠顶膜细胞上插入离子通道或形成孔洞，引起渗透压失衡，使昆虫致死(Gill *et al*., 1992; Schnepf *et al*., 1998)。靶标害虫对 Bt 毒素产生高水平抗性是由于其中肠上特异受体发生改变，从而影响了毒素与受体的结合(Gahan *et al*., 2001; Morin *et al*., 2003)。具有共同结合位点的 Bt 毒素间易产生交互抗性。如对 Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac 和 Cry1F 有抗性的小菜蛾 *P. xylostella* (L.)中肠上具有 1 个共同的结合位点(Ballester *et al*., 1999)。欧洲玉米螟 Cry1Ab 抗性品系对 Cry1Ac 有较高的交互抗性是因为有共同的结合位点(Hua *et al*., 2001; Siqueira *et al*., 2004), Cry1F 抗性欧洲玉米螟与 Cry1Ab 和 Cry9C 不存在交互抗性(Pereira *et al*., 2008), 因为 Cry1F 与 Cry1Ab、Cry9C 没有共同的结合位点(Hua *et al*., 2001)。据报道, Cry1Ia 与 Cry1Ab 和 Cry1Ac 在金钢钻 *Earias insulana* (Boisd.)和花翅小卷蛾 *Lobesia botrana* (Denis & Schiffermuller)幼虫中肠上没有共同的结合位点(de Escudero *et al*., 2006)。Cry1Ac 或 Cry1Ab 抗性亚洲玉米螟与 Cry1Ie 没有交互抗性(韩海亮等, 2009; Xu *et al*., 2010)。本研究结果表明，以 Cry1Ie 毒素汰选的亚洲玉米螟对 Cry1Ie 产生了显著的抗性，但与 Cry1Ab, Cry1Ac 以及 Cry1Fa 没有交互抗性，显示 Cry1Ie 与这些毒素蛋白在亚洲玉米螟幼虫中肠上不存在共同的结合位点。这对于研发和利用双价转基因抗虫玉米或轮换种植转不同基因抗虫玉米进行靶标害虫抗性治理具有重要的指导意义。

"高剂量-避难所"是目前广泛应用的靶标害虫抗性治理策略之一，这一策略有效性的前提条件之一是田间抗、感个体之间能够随机交尾，这就需要抗、感种群在时间和空间上能够相遇。据报道，棉红铃虫 *Pectinophora gossypiella* (Saunders)抗性种群在 Bt 棉花上的平均幼虫发育历期比敏感种群取食常规棉要长 5.7 d，而田间雄蛾的寿命不到 10 d，且 80% 以上个体在羽化后 3 d 内完成交尾，因此抗性治理必须考虑抗性种群发育相对滞后的问题(Liu *et al*., 1999)。本研究结果表明，随着汰选压的提高，亚洲玉米螟抗性种群的发育历期随之延长，当对 Cry1Ie 抗性达到 23 倍时，平均幼虫发育历期延长 5.7 d。自然界，亚洲玉米螟具有交尾栖息场所与产卵场所异地现象(周大荣等, 1995)，即成虫一般在生长茂密的杂草丛或大豆、苜蓿等低杆作物田栖息交尾，晚间飞往寄主作物田如玉米等上产卵。因此空间上应该不存在隔离问题。此外，亚洲玉米螟 1 个世代的发蛾期长延续近 1 个月，因此幼虫期延长 6 d 对抗、感种群的时间相遇不会有显著的影响。然而，由于亚洲玉米螟成虫有选择在一定生育期的玉米上产卵的习性(周大荣等, 1995)，在设计庇护所种植计划时应考虑分期播种，以避免敏感种群因单一播期而人为造成世代的整齐化。

参考文献(References)

Alcantara E, Estrada A, Alpuerto V, 2011. Monitoring Cry1Ab susceptibility in Asian corn borer (Lepidoptera: Crambidae) on Bt corn in the Philippines. *Crop Prot*., 30: 554–559.

Ballester V, Granero F, Tabashnik BE, Malvar T, Ferré J, 1999. Integrative model for binding of *Bacillus thuringiensis* toxins in susceptible and resistant larvae of the diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Appl. Environ. Microbiol*., 65(4): 1413–1419.

Bolin PC, Hutchison WD, Andow DA, 1999. Long-term selection for resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac endotoxin in a Minnesota population of European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). *J. Econ. Entomol*., 92: 1021–1030.

Chang XY, He KL, Wang ZY, Bai SX, 2006. Evaluation of transgenic Bt maize for resistance to cotton bollworm. *Acta Phytophyl. Sin*., 33 (4): 374–378. [常雪艳, 何康来, 王振营, 白树雄, 2006. 转 Bt 基因玉米对棉铃虫的抗性评价. 植物保护学报, 33(4): 374–378]

Chaufaux J, Seguin M, Swanson JJ, Bourguet D, Siegfried BD, 2001. Chronic exposure of the European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) to CrylAb *Bacillus thuringiensis* toxin. *J. Econ. Entomol*., 94: 1564 –1570.

Crespo ALB, Rodrigo-Simón A, Siegfried BD, 2011. Cross-resistance and mechanism of resistance to Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* in a field-derived strain of European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *J. Invert. Pathol*., 107: 185–192.

Crespo ALB, Spencer TA, Alves AP, Hellmich RL, Balmkenship EE, Magalhäes LC, Siegfried BD, 2009. On-plant survival and inheritance of resistance to Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* in a field-derived strain of European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *Pest Manag. Sci*., 65: 1071–1081.

de Escudero IR, Estela A, Porcar M, 2006. Molecular and insecticidal characterization of a Cry1I protein toxic to insects of the families Noctuidae, Tortricidae, Plutellidae and Chrysomelidae. *Appl. Environ. Microbiol*., 72(7): 4796–4804.

Ferré J, Van Rie J, 2002. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol*., 47: 501–533.

Gahan LJ, Gould F, Heckel DG, 2001. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science*, 293: 857–860.

Gill SS, Cowles EA, Pietrantonio PV, 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu. Rev. Entomol.*, 37: 615 - 636.

Gould F, 1998. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. *Annu. Rev. Entomol.*, 43: 701 - 726.

Han HL, Li GT, Wang ZY, Zhang J, He KL, 2009. Cross-resistance of Cry1Ac-selected Asian corn borer to other Bt toxins. *Acta Phytophyl. Sin.*, 36(4): 329 - 334. [韩海亮，李光涛，王振营，张杰，何康来，2009. Cry1Ac 抗性亚洲玉米螟对四种 Bt 蛋白的交互抗性. 植物保护学报，36(4): 329 - 334]

He KL, Wang ZY, Wen LP, 2005. Determination of baseline susceptibility to Cry1Ab protein for Asian corn borer (Lepidoptera: Crambidae). *J. Appl. Entomol.*, 129(8): 407 - 412.

He KL, Wang ZY, Zhou DR, Wen LP, Song YY, Yao ZY, 2003. Evaluation of transgenic Bt corn for resistance to the Asian corn borer (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.*, 96: 935 - 940.

Hellmich RL, Siegfried BD, Sears MK, Stanley-Horn DE, Daniels MJ, 2001. Monarch larvae sensitivity to *Bacillus thuringiensis*-purified proteins and pollen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 11925 - 11930.

Hua G, Masson L, Jurat-Fuentes JL, Schwab G, Adang MJ, 2001. Binding analyses of *Bacillus thuringiensis* Cry delta-endotoxins using brush border membrane vesicles of *Ostrinia nubilalis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 872 - 879.

Huang FN, Higgins RA, Buschman LL, 1997. Baseline susceptibility and changes in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* under selection pressure in European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.*, 90: 1137 - 1143.

James C, 2003. Global Review of Commercialized Transgenic Crops: Feature: Bt Maize. ISAAA Briefs 29.

James C, 2012. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops. ISAAA Brief 44. 125 - 134

Li HR, Oppert B, Higgins RA, Huang FN, Buschman LL, Zhu KY, 2005. Susceptibility of Dipel-resistant and susceptible *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) to individual *Bacillus thuringiensis* protoxins. *J. Econ. Entomol.*, 98(4): 1333 - 1340.

Lian Y, Jia ZW, He KL, Liu YJ, Song FP, Wang BM, Wang GY, 2008. Transgenic tobacco plants expressing synthetic Cry1Ac and Cry1Ie genes are more toxic to cotton bollworm than those containing one gene. *Chinese Science Bulletin*, 53(9): 1381 - 1387.

Liu YB, Tabashnik BE, Dennehy TJ, Patin AL, Bartlett AC, 1999. Development time and resistance to Bt crops. *Nature*, 400: 519.

Lu MG, Rui CH, Zhao JZ, Jian GL, Fan XL, Gao XW, 2004. Selection and heritability of resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and transgenic cotton in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Manag. Sci.*, 60: 887 - 893.

McGaughey WH, 1985. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science*, 229(4709): 193 - 195.

Meng FX, Shen JL, Zhou WJ, Chen HM, 2003. Long-term selection for resistance to transgenic cotton expressing *Bacillus thuringiensis* toxin in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Manag. Sci.*, 60: 167 - 172.

Morin S, Biggs RW, Sisterson MS, Shriver L, Ellers-Kirk C, 2003. Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 5004 - 5009.

Naranjo SE, Head G, Dively GP, 2005. Field studies assessing arthropod nontarget effects in Bt transgenic crops: introduction. *Environ. Entomol.*, 34: 1178 - 1180.

Pereira EJG, Lang BA, Siegfried BD, Storer NP, Siegfried BD, 2008. Selection for Cry1F resistance in the European corn borer and cross-resistance to other Cry toxins. *Entomol. Exp. Appl.*, 126(2): 115 - 121.

Roush RT, 1997. Bt-transgenic crops: just another pretty insecticide or a chance for a new start in resistance management? *Pest. Sci.*, 51: 328 - 334.

Roush RT, 1998. Two-toxin strategies for management of insecticidal transgenic crops: can pyramiding succeed where pesticide mixtures have not? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B Biological Sciences*, 353: 1777 - 1786.

Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean DH, 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62(3): 775 - 806.

Shelton AM, Zhao JZ, Roush RT, 2002. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. *Annu. Rev. Entomol.*, 47: 845 - 881.

Siqueira HAA, Moellenbeck D, Spencer T, Siegfried BD, 2004. Cross-resistance of Cry1Ab-selected *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) to *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *J. Econ. Entomol.*, 97: 1049 - 1057.

Song FP, Zhang J, Gu AX, Wu Y, Han LL, He KL, Chen ZY, Yao J, Hu YQ, Li GX, Huang DF, 2003. Identification of *cry1I*-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains and characterization of a novel *cry1I*-type gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(9): 5207 - 5211.

Storer NP, Babcock JM, Schlenz M, Meade T, Thompson GD, Bing JW, Huckaba RM, 2010. Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. *J. Econ. Entomol.*, 103(4): 1031 - 1038.

Storer NP, Kubiszak ME, Ed King J, Thompson GD, Santos AC, 2012. Status of resistance to Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: lessons from Puerto Rico. *J. Invert. Pathol.*, 110(3): 294 - 300.

Tabashnik BE, 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.*, 39: 47 - 79.

Wang P, He KL, Wang ZY, Wang YL, 2012. Evaluating transgenic *cry1Ac* maize for resistance to *Ostrinia furnacalis* (Guenée). *Acta Phytophyl. Sin.*, 39(5): 395 - 400. [王培，何康来，王振营，王应伦，2012. 转 *cry1Ac* 玉米对亚洲玉米螟的抗性评价. 植物保护学报，39(5): 395 - 400]

Wang ZY, Wang DY, He KL, Bai SX, Cong B, 2005. Evaluation the control effects of the transgenic *Bacillus thuringiensis* corn expressing CrylAb protein on the larvae of *Mythimna separata* (Walker) in laboratory. *Acta Phytophyl. Sin.*, 32(2): 153 - 157. [王振营，王

冬妍，何康来，白树雄，丛斌，2005. 转 Bt 基因玉米对粘虫的室内杀虫效果评价. 植物保护学报，32(2)：153－157]

Wu XY, Leonard BR, Zhu YC, 2009. Susceptibility of Cry1Ab-resistant and -susceptible sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae) to four *Bacillus thuringiensis* toxins. *J. Invert. Pathol.*, 100: 29－34.

Xu LN, Wang ZY, Wang ZY, Zhang J, He KL, Ferry N, Gatehouse AMR, 2010. Cross-resistance of Cry1Ab-selected Asian corn borer to other Cry toxins. *J. Appl. Entomol.*, 134: 429－438.

Yang ZJ, Lang ZH, Zhang J, Song FP, He KL, Huang DF, 2012. Studies on insect-resistant transgenic maize (*Zea mays* L.) harboring Bt *cry1Ah* and *cry1Ie* genes. *J. Agric. Sci. Technol.*, 14(4): 39－45. [杨召军，郎志宏，张杰，宋福平，何康来，黄大昉，2012. 转 Bt *cry1Ah/cry1Ie* 双价基因抗虫玉米的研究. 中国农业科技导报，14(4)：39－45]

Yue TQ, Lang ZH, Wang YF, Zhang J, He KL, Huang DF, 2010. Acquirement of the transgenic maize harboring Bt *cry1Ah* gene and analysis of its inheritable stability. *J. Agric. Biotechnol.*, 18(4): 638-644. [岳同卿，郎志宏，王延锋，张杰，何康来 黄大昉，2010. 转 Bt *cry1Ah* 基因抗虫玉米的获得及其遗传稳定性分析. 农业生物技术学报，18(4)：638－644]

Zhang YW, Liu YJ, Ren Y, Liu Y, Liang GM, Song FP, Bai SX, Wang JH, Wang GY, 2013. Overexpression of a novel *cry1Ie* gene confers resistance to Cry1Ac-resistant cotton bollworm in transgenic lines of maize. *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.*, 115: 151－158

Zhao JZ, Cao J, Li YX, Collins HL, Roush RT, 2003. Transgenic plants expressing two *Bacillus thuringiensis* toxins delay insect resistance evolution. *Nat. Biotech.*, 21: 1493－1497.

Zhou DR, He KL, Wang ZY, Ye ZH, Wen LP, Gao YX, Song YY, 1995. Asian Corn Borer and Its Integrated Management. Golden Shield Press, Beijing. [周大荣，何康来，王振营，叶志华，文丽萍，高云霞，宋彦英，1995. 亚洲玉米螟综合防治技术. 北京：金盾出版社]

（责任编辑：赵利辉）